

# 靶向性超抗原 EGF-SEA 融合基因的构建及表达\*

谢洋<sup>1</sup> 彭韶平<sup>1</sup> 廖志莹<sup>1</sup> 刘家峰<sup>1</sup> 刘雪梅<sup>1</sup> 陈伟峰<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:构建金黄色葡萄球菌肠毒素 A (SEA)和表皮生长因子(EGF)表达载体。方法:利用 PCR 及 RT-PCR 技术分别克隆出 SEA 基因及 EGF 基因片断,以经过改良优化的桥式 PCR 将 2 个基因融合,再转入表达载体 pET-44,经诱导剂诱导后分泌 SEA-EGF 融合蛋白。结果:所得 SEA、EGF 基因测序结果显示与 GENE BANK 中公布的标准序列一致,且成功融合 SEA-EGF 基因并成功导入表达载体。结论:该研究成功构建了 SEA-EGF 表达载体,为进一步研究 SEA-EGF 融合蛋白抗头颈肿瘤靶向免疫治疗奠定了基础。

**[关键词]** 金黄色葡萄球菌肠毒素 A;表皮生长因子;超抗原;靶向治疗

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2014.09.015

**[中图分类号]** R739.6 **[文献标志码]** A

## Construction and expression of the targeting super-antigen EGF-SEA fusion gene

XIE Yang PENG Shaoping LIAO Zhiying LIU Jiafeng LIU Xuemei CHEN Weifeng  
(Department of Otolaryngology, the First Hospital of Gannan Medical University, Ganzhou, 341000, China)

Corresponding author: PENG Shaoping, E-mail: pspshns@126.com

**Abstract Objective:** To construct expression vector for the SEA-EGF fusion gene. **Method:** Clone the SEA gene and the EGF gene segment with PCR and RT-PCR independently, and connect this two genes by the bridge PCR. Insert the fusion gene EGF-SEA into the expression vector PET-44. Induced the secretion of the fusion protein SEA-EGF by the antileptic. **Result:** The gene fragment encoding EGF and SEA mature peptide was successfully cloned. The fusion gene EGF-SEA was successfully constructed and was inserted into expression vector. **Conclusion:** The new recombinant expression vector for fusion gene EGF-SEA is specific for head and neck cancer, laid the foundation for the further study of fusion protein SEA-EGF targeting immune therapy in head and neck tumors.

**Key words** staphylococcus aureus enterotoxin A; epidermal growth factor; superantigen; targeted therapy

金黄色葡萄球菌肠毒素 A(staphylococcus aureus enterotoxin A, SEA)是近年来研究比较多的一种超抗原,它可以直接结合于 MHC II 类分子沟槽外侧和 T 细胞 TCR 的 V $\beta$  区,可同时激活大部分 T 细胞,释放大细胞因子,是一种很强的免疫激活剂,具有显著的抗肿瘤效应<sup>[1]</sup>。然而单纯的 SEA 在介导活化的 T 细胞杀伤肿瘤细胞的同时也可杀伤 B 细胞、巨噬细胞、树突状细胞和胸腺上皮细胞等正常机体细胞,单独全身使用具有诸多不良反应<sup>[2]</sup>。研究发现在多种癌细胞尤其是在头颈部鳞状细胞癌细胞膜存在表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)受体的过度表达<sup>[3]</sup>。本研究拟通过基因重组方法构建 EGF 基因与 SEA 成熟肽片段相融合,构建重组 EGF-SEA 基因表达载体,为进一步研究 SEA-EGF 融合蛋白抗肿瘤靶向免疫治疗奠定基础,为临床治疗头颈部鳞状细胞癌

提供指导。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌种、载体及引物** SEA TCC-13565 购自北京中国药品与生物制品检定所保藏中心。大肠杆菌 JM109、pGEM-T、T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司。载体质粒 pET44a、宿主大肠杆菌 Rosetta 购自 Novagen 公司。PCR 引物参照 GENE BANK 公布序列自行设计,并由广州英杰以及上海生工生物工程技术有限公司合成。所有引物序列见表 1。

**1.1.2 试剂** Taq 聚合酶、10 $\times$  PCR buffer、dNTP Mixture、RNase 抑制剂、IPTG、X-gal 及 DL2000 DNA marker 等购自大连宝生物工程。Nde I、Pst I 内切酶购自 Takara 公司。琼脂糖、聚蛋白脲、酵母以及 SYBR Green 荧光染料等购自基因公司。RNA、DNA 提取试剂盒、PCR 产物回收纯化试剂盒及质粒抽提试剂盒购自 QIAGEN 公司。逆转录试剂盒购自 New England Biolabs 公司。

\* 基金项目:江西省卫生厅科技计划(No:20091204)

<sup>1</sup> 赣南医学院第一附属医院耳鼻咽喉科(江西赣州,341000)

通信作者:彭韶平, E-mail: pspshns@126.com

表 1 构建融合基因 SEA-EGF 过程中所用的引物

引物	5'→3'	温度/℃
SEA5	GTCATATGAGCGAGAAAAGCGAAGAAATAAATGA	70.2
SEA3	ACTTGTATATAAATATATATCAATATGCATGT	55.2
EGFF	AATAGTGACTCTGAATGTCCCCTGTC	63.0
EGFR	GTCTGCAGTTATTAGCGCAGTTCACCACCTCA	76.0
CSEA3-1	GAGTCACTATTACTTGTATATAAATATATATCAATATGCATGT	62.4
CSEA3-E	GGACATTCAGAGTCACTATTACTTGTATATAAATATATATCAAT	63.7
CEGF-5	TATTGATATATATTTATATACAAGTAATAGTGACTCTGAATGTCCCC	66.8

## 1.2 方法

**1.2.1 SEA DNA 的提取** 参照 QIAGEN 公司 DNA 提取试剂盒说明书操作。

**1.2.2 SEA 成熟肽基因的 PCR 扩增** 用 OMIGA 引物设计软件自行设计引物,在上游引物引入 Nde I 酶切位点。PCR 采用 25  $\mu$ l 反应体系,反应条件:95 $^{\circ}$ C 2 min,94 $^{\circ}$ C 40 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 70 s,每个循环降 1 $^{\circ}$ C,至 55 $^{\circ}$ C,再进入 30 个大循环,72 $^{\circ}$ C 10 min,4 $^{\circ}$ C $\infty$ 。所得产物经 TA 克隆载体转入大肠杆菌 JM109。

**1.2.3 人腮腺组织 RNA 的提取** 取新鲜的人正常腮腺组织 10 mg,液氮速冻后,依照 QIAGEN 公司 RNA 提取试剂盒说明书操作。所得产物经琼脂糖凝胶甲醛变性电泳鉴定后采用逆转录试剂盒 (ProtoScript<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit) 合成 cDNA。

**1.2.4 EGF 基因的 PCR 扩增** 用引物设计软件自行设计引物,在下游引物引入 Pst I 酶切位点,取所得 cDNA 产物 10 倍稀释后进行 PCR 扩增。以 Touchdown PCR 扩增,反应条件:95 $^{\circ}$ C 2 min,94 $^{\circ}$ C 40 s,68 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 40 s,每个循环降 1 $^{\circ}$ C,至 63 $^{\circ}$ C,再进入 30 个大循环,72 $^{\circ}$ C 10 min,4 $^{\circ}$ C $\infty$ 。所得 PCR 产物经 TA 克隆载体转入大肠杆菌 JM109。

**1.2.5 SEA-EGF 融合基因的桥联及 PCR 扩增** 以提取含 SEA 片段大肠杆菌质粒为模板。续贯以 SEA F/CSEA3-1 及 SEA F/CSEA3-E 为引物行 PCR 扩增延伸,得产物 A。再提取含 EGF 片段大肠杆菌质粒为模板。以 EGFR/CEGF-5 为引物行 PCR 扩增,得产物 B。将 A 及 B 以 1:10 混合后行 PCR。具体如下:循环 1(1 $\times$ ):95 $^{\circ}$ C 2 min,以 0.1 $^{\circ}$ C/s 速度递减至 62.7 $^{\circ}$ C;62.7 $^{\circ}$ C 2 min,72 $^{\circ}$ C 5 min;循环 2(5 $\times$ ):94 $^{\circ}$ C 40 s;73 $^{\circ}$ C 30 s,循环 1 之后降低 1 $^{\circ}$ C,72 $^{\circ}$ C 70 s;循环 3(30 $\times$ ):94 $^{\circ}$ C 40 s,70 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 70 s;循环 4(1 $\times$ ):72 $^{\circ}$ C 10 min;循环 5(1 $\times$ ):4 $^{\circ}$ C $\infty$ 。

**1.2.6 TA 克隆及测序** 将回收纯化之 PCR 产物连接入 pGEM-T 载体 T 位点后,经转化、蓝白斑筛选阳性菌落,并提取质粒 pGEM-SEA-EGF,通过菌

落 PCR 鉴定后,送上海博尚生物技术服务有限公司测序。

**1.2.7 重组表达载体的构建** 将重组质粒 pGEM-SEA-EGF 及含 pET44 质粒分别用 Nde I、Pst I 内切酶双酶切,回收目的片段,用 T4DNA 连接酶连接,连接产物转化至感受态 JM109 中,提取质粒,将酶切分析及 PCR 扩增鉴定为阳性的重组质粒转入 Rosetta 感受态细胞中,经筛选获得原核表达重组质粒 pETSEA-EGF。

**1.2.8 目的基因的诱导表达** 取含有重组子的 Rosetta 单菌落于 5 ml 含有 Amp 的液体 LB 培养基中培养过夜。1:100 接种于含 50 mg/L 氨苄 LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C 培养 3~4 h 至对数生长期( $A_{600}$  值约为 0.6),加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L,诱导表达目的蛋白。进行 SDS-PAGE 分析。

## 2 结果

SEA 成熟肽基因 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析显示于 700 bp 左右出现目的条带,测序证实与 Genbank 数据库中 SEA 序列完全一致。见图 1。EGF 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析显示于 160 bp 左右出现目的条带,测序证实与 Genbank 数据库中 EGF 序列一致。见图 2。

SEA-EGF 融合基因 PCR 产物电泳图见图 3。

经序列比对结果显示所获 SEA-EGF 融合基因序列在第 233 及 845 位出现点突变,分析显示不影响氨基酸序列及生物活性,见图 4。

采用限制性内切酶 Nde I 和 Pst I 对 pET44a-SEA-EGF 重组子进行双酶切鉴定。初步判定目的基因已经插入表达载体,见图 5。

重组质粒 pEGF40 转化相应的表达宿主菌 E. Coli BL21 ( $\lambda$ DE3) 中,用 IPTG 诱导不同时间 (1,3 h) 进行 SDS-PAGE 检测,结果 SEA-EGF 在相对分子质量约为 33 000 处有明显表达带,与理论值相符。见图 6。

## 3 讨论

SEA 是一类由金黄色葡萄球菌分泌产生的细菌毒素超抗原<sup>[4]</sup>。SEA 在 ng 甚至 pg 水平时即可刺激人的 T 细胞增殖,并且能够明显增强 T 细胞的活性,具有抗肿瘤特性。然而单用 SEA 的抗肿

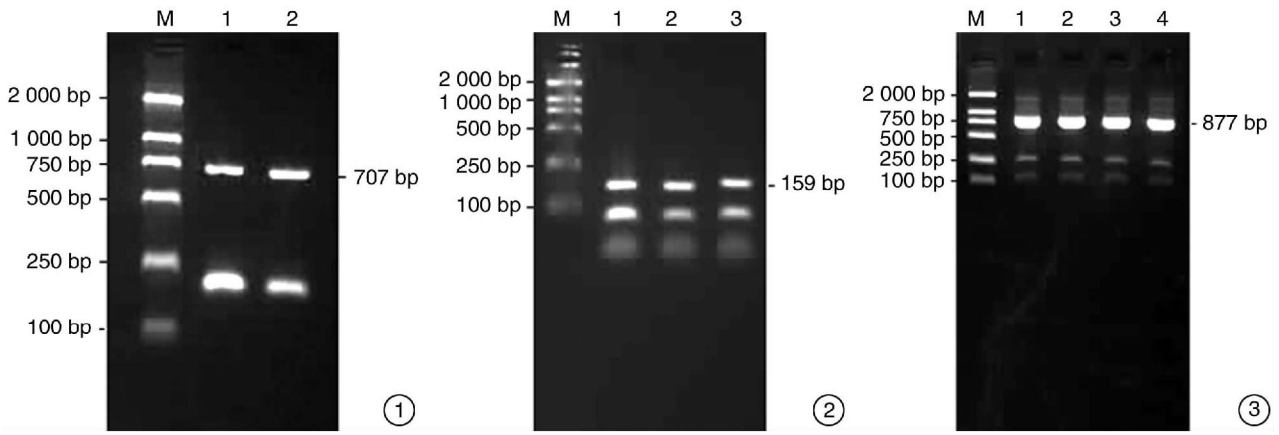


图 1 SEA 成熟肽基因琼脂糖凝胶电泳 M;DNA marker DL2000 条带;1,2;SEA 产物,在 700 bp 左右可见 SEA 基因条带; 图 2 EGF 基因琼脂糖凝胶电泳 M;DNA marker DL2000 条带;1~3;EGF 产物,在 160 bp 左右可见 EGF 基因条带; 图 3 SEA-EGF 融合基因 PCR 产物电泳图 M;DNA marker DL2000 条带;1~4;EGF 产物,于 880 bp 左右可见 SEA-EGF 基因条带。

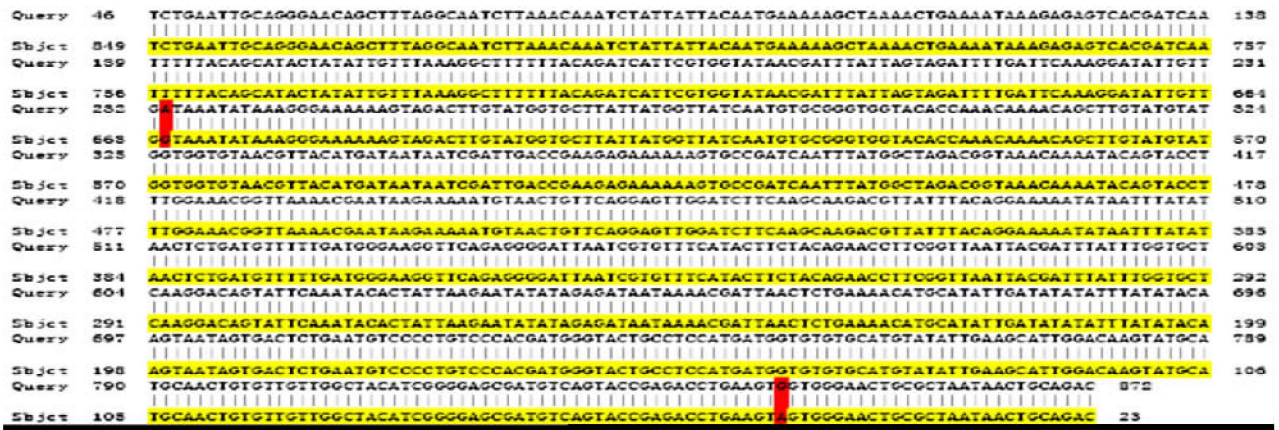


图 4 重组基因 SEA-EGF 区与原始序列比对图

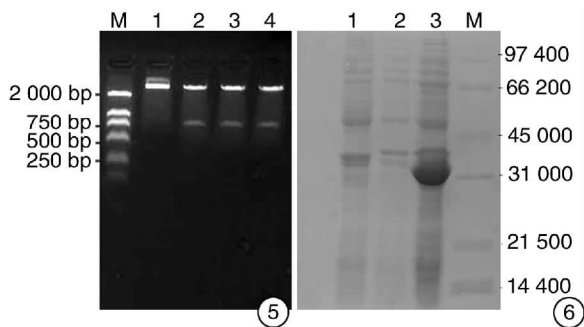


图 5 重组子的酶切鉴定 M;DNA marker DL2000 条带;1:未酶切的质粒;2~4:酶切反应液; 图 6 融合蛋白的诱导表达 M;DNA marker DL 2000 条带; 1~3:重组质粒 pEGF40 转化相应的表达宿主菌 E. ColiBL21(λDE3)中,用 IPTG 诱导表达后的 3 个样本。

瘤作用缺乏特异性,那些表达有 MHC II 类分子的 B 细胞和巨噬细胞等抗原递呈细胞也有可能成为 SDCC 的靶细胞而被杀灭<sup>[5]</sup>。加之其抗肿瘤作用依赖于 MHC II 类分子,但大多数肿瘤并不表达 MHC

II 类分子,所以单用超抗原具有诸多的弊端而使其应用受到限制。因此需提高超抗原对肿瘤细胞的亲合力而减弱对 MHC II 类分子的依赖性,同时仍保持其强烈激活 T 细胞的特性,即把超抗原激活 T 细胞的作用限制在肿瘤局部而避免对其他细胞的损伤。因此把超抗原与抗体或肿瘤特异性细胞因子偶联靶向治疗可以实现上述目的<sup>[6-7]</sup>。

目前,超抗原的靶向性抗肿瘤主要有 2 种模式,一是以肿瘤特异性的抗体,另一种是利用针对肿瘤细胞表明特异性受体的具有靶向作用的特异性配体因子。EGFR 在肿瘤细胞中存在非常普遍的过度表达,许多恶性肿瘤尤其在头颈鳞状细胞癌中可出现一种或几种 EGFR 家族受体过表达和(或)突变。为此,本实验在鼻咽癌甚至其他头颈部肿瘤中具有 EGFR 过度表达的基础上,选用了与人体具有同源性的人 EGF,作为 EGFR 的天然配体,能与 EGFR 特异结合。在理论上也避免了上述产生自身抗体的问题。

(下转第 656 页)

查,及时发现病情变化并行相应处理。

参考文献

[1] STROJAN P, SOBA E, LAMOVEC J, et al. Extramedullary plasmacytoma: clinical and histopathologic study [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2002, 53: 692-701.

[2] 杨普,李智勇,武铁,等. 额眶沟通颅骨原发淋巴瘤手术切除一期颅底修复 1 例[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2011, 10(5): 473-474.

[3] 周光耀,高炳庆,刘亚峰,等. 12 例头颈部髓外浆细胞瘤的病理与免疫组织化学研究 [J]. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 2000, 14(3): 168-170.

[4] 邵瑾燕,刘明,汤建国. 鼻浆细胞瘤 3 例[J]. *临床耳鼻咽喉科杂志*, 2005, 19(24): 1148-1149.

[5] GROVER N, CHARY G, MAKHIJA P, et al. Extramedullary plasmacytoma of the nasal cavity treatment perspective in a developing nation [J]. *Ear Nose Throat J*, 2006, 85: 434-436.

[6] ALEXIOU C, KAU R J, DIETZFELBINGER H, et al. Extramedullary plasmacytoma: tumor occurrence and therapeutic concepts [J]. *Cancer*, 1999, 85: 2305-2314.

[7] 臧健,王琰,姜学钧. 喉髓外浆细胞 1 例[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2011, 25(1): 40-41.

[8] 杨曙,肖自安,王树辉,等. 头颈部髓外浆细胞瘤临床

分析[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2007, 21(18): 817-819.

[9] SUSNERWALA S S, SHANKS J H, BANERJEE S S, et al. Extramedullary plasmacytoma of the head and neck region: clinicopathological correlation in 25 cases [J]. *Br J Cancer*, 1997, 75: 921-927.

[10] MILLER F R, LAVERTU P, WANAMAKER J R, et al. Plasmacytomas of the head and neck [J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1998, 119: 614-618.

[11] 杨迪生,范顺武,陶惠民,等. 骨的孤立性浆细胞瘤和髓外浆细胞瘤 [J]. *中华肿瘤杂志*, 1996, 18(1): 41-43.

[12] 胡建斌,孙晓南,杨起初. 髓外浆细胞瘤的诊断和治疗 [J]. *肿瘤*, 2002, 22(3): 240-241.

[13] 王维虎,李素艳,高黎,等. 髓外浆细胞瘤临床分析 [J]. *中华放射肿瘤杂志*, 2004, 13(3): 211-214.

[14] ROLINS H, LEVIN M, GOLDBERG S, et al. Solitary extramedullary plasmacytoma of the epiglottis: a case report and review of the literature [J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1995, 112: 754-757.

[15] SOUTAR R, LUCRAFT H, JACKSON G, et al. Guidelines on the diagnosis and management of solitary plasmacytoma of bone and solitary extramedullary plasmacytoma [J]. *Br J Haematol*, 2004, 124: 717-726.

(收稿日期: 2013-08-28)

(上接第 640 页)

SEA 与 EGF 在基因序列上完全不具有同源性,为获得足够的同源区域,我们设计了 3 对中间引物 CSEA3-1、CSEA3-E、CEGF-5 分别延伸 SEA 及 EGF,使得 SEA 与 EGF 各自在连接端获得了一段具有同源性的区域。再以 PCR 进行延伸扩增,最后获得了融合基因 SEA-EGF,并将所克隆的融合基因插入载体中表达,进而分离纯化,最终诱导表达。经序列比对显示,所获 SEA-EGF 融合基因序列在第 233 及 845 位出现点突变,考虑酶的自身保真性不够所致,经分析显示不影响氨基酸序列及生物活性。

本实验从基因水平将上述 2 种非同源序列进行重组连接,相对于从蛋白水平进行偶联的方式具有更加稳定的结构,理论上更能发挥其刺激机体免疫及抗肿瘤功能。SEA-EGF 融合蛋白的成功表达使得进一步将其批量表达并纯化成为可能,为进一步的细胞及动物实验奠定了基础。

参考文献

[1] HEDLUND G, DOHLSTEN M, PETRSSON C, et al. Superantigen-based tumor therapy in vivo activation of cytotoxic T cell [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 1993,

36: 89-91.

[2] ARAD G, LEVY R, KAEMPFER R. Superantigen concomitantly induces Th1 cytokine genes and the ability to shut off the irexpression on reexposure to superantigen [J]. *Immunol Lett*, 2002, 82: 75-77.

[3] BOURHIS J. Epidermal growth factor receptor (EGF) in head and neck cancers [J]. *Bull Cancer*, 2007, 94(7 Suppl): 189-191.

[4] BALABAN N, RASOOLY A. Staphylococcal enterotoxins [J]. *Int J Food Microbiol*, 2000, 61: 1-10.

[5] SHAW D M. A phase II study of a 5T4 oncofoetal antigen tumour-targeted superantigen (ABR-214936) therapy in patients with advanced renal cell carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2007, 96: 567-574.

[6] ORSBERG G. Therapy of human non-small-cell lung carcinoma using antibody targeting of a modified superantigen [J]. *Br J Cancer*, 2001, 85: 129-136.

[7] ILBACK N G. A new screening model for safety evaluation of superantigen-antibody recombinant fusion proteins (mAb Fab-SEA/E) using telemetric monitoring in conscious rabbits [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2002, 48: 31-39.

(收稿日期: 2013-10-23)